

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2002058479
PUBLICATION DATE : 26-02-02

APPLICATION DATE : 14-08-00
APPLICATION NUMBER : 2000245677

APPLICANT : CANON INC;

INVENTOR : NOMOTO TAKESHI;

INT.CL. : C12N 15/09 G01N 33/68 // C07K 7/08

TITLE : METHOD FOR OBTAINING CONFORMATIONAL RECOGNITION AMINO ACID SEQUENCE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for simply discovering a conformational recognition amino acid sequence used as a peptide usable for detecting in a high precision whether or not a target chemical substance is present in a biological sample containing other miscellaneous chemical substance and having an amino acid sequence to be selectively bonded only to the target chemical substance.

SOLUTION: A peptide library is screened based on bonding ability with the target chemical substance. When peptides not substantially causing a bonding with other biological materials are further screened by using a biological sample containing the other biological materials, among a group of peptides which are to be selected and have bonding ability with the target chemical substance, an interference by an admixture is eliminated and an amino acid sequence of a peptide to be selectively bonded only to the objective target chemical substance can be collected.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-58479
(P2002-58479A)

(43) 公開日 平成14年2月26日 (2002.2.26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト ⁸ (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 33/68	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/68		C 0 7 K 7/08	Z C C 4 B 0 2 4
// C 0 7 K 7/08	Z C C	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2000-245677(P2000-245677)

(22) 出願日 平成12年8月14日 (2000.8.14)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 野本 毅

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

Fターム(参考) 2G045 AA34 CA25 CA26 CB01 DA36

FA11

4B024 AA11 AA20 BA80 HA11

4H045 AA10 BA16 CA40 EA50 FA72

FA74

(54) 【発明の名称】 構造認識アミノ酸配列の取得方法

(57) 【要約】

【課題】 標的化学物質のみと選択的に結合するアミノ酸配列を有し、他に雑多な化学物質を含有する生体試料中に、目的とする標的化学物質が存在するか否かを高い確度で検定する目的にも利用が可能なペプチドに用いる構造認識アミノ酸配列を簡便に見出す方法の提供。

【解決手段】 標的化学物質との結合能に基づき、ペプチドライブラリーをスクリーニングした後、選別される標的化学物質との結合能を有する一群のペプチドについて、その他の生体物質を含む生体試料を用いて、他の生体物質との結合は実質的に起こさないペプチドのみを更にスクリーニングすると、挟雑物による干渉を排し、目的とする標的化学物質とのみ選択的に結合するペプチドのアミノ酸配列を採取することが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料に含有される標的化学物質の構造を認識し、前記標的化学物質と選択的な結合形成するペプチドに利用される構造認識アミノ酸配列を決定する方法であって、

所定のアミノ酸長を有する可変領域がランダムなアミノ酸配列で構築されてなるペプチドライブラリーから、前記標的化学物質のみを担体上に固定化してなる第1のスクリーニング担体を用いて、前記第1のスクリーニング担体上に吸着するペプチド画分を分取する第1のスクリーニング工程と、

前記第1のスクリーニング工程で採取される吸着するペプチド画分に含まれるペプチド群から、前記生体試料に含有される、前記標的化学物質以外の生体物質を非選択的に担体上に固定化してなる第2のスクリーニング担体を用いて、前記第2のスクリーニング担体上に吸着するペプチド画分を除き、前記第2のスクリーニング担体上に吸着しないペプチド画分のみを分取する第2のスクリーニング工程と、

前記第2のスクリーニング工程で採取される、前記標的化学物質との結合能を有し、かつ、前記生体試料に含有される、その他の生体物質とは有意に結合しないペプチド画分から、それに含まれる各ペプチドについて、少なくとも、その由来するペプチドライブラリーの可変領域を含む、所定アミノ酸長の部分アミノ酸配列を決定するアミノ酸配列解析工程とを含み、

前記のアミノ酸配列解析工程において、解明された前記各ペプチドの有する部分アミノ酸配列から前記ペプチドライブラリーの可変領域に相当する構造認識アミノ酸配列を決定することを特徴とする構造認識アミノ酸配列の取得方法。

【請求項2】 前記標的化学物質がタンパク質であることを特徴とする請求項1に記載の構造認識アミノ酸配列の取得方法。

【請求項3】 前記第2のスクリーニング担体の調製にもちいる担体として、陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂との混合物からなる担体を用いることを特徴とする請求項1または2に記載の構造認識アミノ酸配列の取得方法。

【請求項4】 前記標的化学物質を含有する可能性を有する生体試料自体は、血漿または細胞破碎抽出液であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の構造認識アミノ酸配列の取得方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体試料に含有される標的化学物質と選択的に結合するペプチドの、かかる結合形成に関与するアミノ酸配列を取得する方法に関する。より具体的には、標的化学物質の構造を識別し、それと特異的に結合を形成するペプチド上、その構

造認識に関与するアミノ酸配列を取得する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトや哺乳動物などから採取される生体試料、例えば、血液や体液などの中には種々の化学物質が存在している。それら生体試料中に含有されて化学物質には、ある種の疾病に罹ったときに出現したり増加するタンパク質性マーカーや、極微量で生体機能を司るタンパク質ペプチドホルモンなどが含まれ、この種の生体内の状況を反映する化学物質を検出、識別する技術の開発は極めて有用である。

【0003】従来、生体試料中の標的化学物質を認識して、選択的に結合する物質として、モノクローナル抗体が知られている。また、固相合成により調製されたペプチドライブラリーやファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーの中から、標的化学物質を認識して、それと結合する画分を分取し、その画分に含まれるペプチドを単離して、そのアミノ酸配列を決定する手法を利用し、標的化学物質と選択的な結合をするペプチド、特に、その目的とする構造認識アミノ酸配列を取得する方法も知られている。

【0004】なお、従来のモノクローナル抗体を創製する技術の概略は、先ず、免疫動物を標的化学物質を用いて免疫感作し、この標的化学物質に対する抗体の産生能を獲得した動物から脾臓細胞を取り出す。次いで、かかる獲得免疫による抗体産生能を示す細胞と、ミエローマ細胞などの試験管内で培養できる細胞とを融合した細胞（ハイブリドーマ）を作製する。融合細胞（ハイブリドーマ）群をスクリーニングして、目的の反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選別する。選別されたハイブリドーマ細胞株を培養して、目的とするモノクローナル抗体の調製を行うというものである。

【0005】一方、ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーを利用して、標的化学物質と選択的な結合能を有するペプチドを採取する従来方法の概略は次の通りである。予め、ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドをコードする合成DNAを、繊維状ファージベクターM13もしくはfdのコート蛋白質であるpIIIの遺伝子の中にクローン化して、ペプチドライブラリーを構築する。この合成DNAでコードされるペプチドは、pIIIの機能に有意に干渉することのない部位に挿入され、ファージ粒子表面のpIIIの一部として発現される。従って、ランダムなアミノ酸配列をコードする、挿入された合成DNAに応じて、非常に大きなペプチドライブラリーを構築することができる（Science, 249, 386 (1990)やProc.Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990)などを参照）。カラムやプレート上に精製した標的タンパク質を直接固定化する、あるいは抗体などを介して固定化するなどして、この固定化された標的タンパク質に上記

ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーを接触させる。非結合ファージは洗浄して洗い流し、その後、結合しているファージを酸などで溶出し、回収した画分を中和した後、大腸菌に感染させて、ファージの増幅を行う。

【0006】更に、前記の回収した画分に含まれるファージを、再び、固定化された標的タンパク質に接触させ、結合画分を分離回収する。この選別操作を、合計3段回〜4段回繰り返すと、標的タンパク質に高い親和性を示すファージが濃縮される。最終的に濃縮されたファージ画分には同等の親和性を示すファージが数種含まれることも多いが、このファージ画分から、単一のクローンを分離・採取するため、再度大腸菌にファージを感染させ、抗生物質などを含んだ寒天培地上でシングル・コロニーを形成させる。個々のコロニーを液体培地に接種し、再培養した後、上清中のファージをポリエチレングリコールなどで沈澱濃縮する。単離した各クローン（ファージ）について、所定の部位に挿入されている合成DNAの塩基配列を決定することにより、かかるクローンに由来する、標的タンパク質と結合するペプチドのアミノ酸配列を知ることができる。例えば、特開平11-29597号公報には、前記の方法を利用して、大腸菌リボヌクレアーゼHIと結合するペプチドを採取できることが開示されている。また、特開平11-290076号公報には、天然型タンパク質と変性型タンパク質との間において、その構造的な差異を識別し、選択的に結合するペプチド、すなわち、構造認識アミノ酸配列を取得する方法が開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述するモノクローナル抗体は一旦創製されると、一般に標的化学物質に対して優れた選択性を示すものの、目的とするモノクローナル抗体を産生する融合細胞（ハイブリドーマ）が得られるか、否かは、多分に偶然に左右される。すなわち、獲得免疫が確立されるか否かは、偶然に支配されることが多い。加えて、獲得免疫の確立、ハイブリドーマの作製、その後のスクリーニングなど、モノクローナル抗体を産生する融合細胞（ハイブリドーマ）の創製自体、相当の時間を要するものである。また、モノクローナル抗体は、前記ハイブリドーマの培養物から単離・精製を経て初めて入手できるものであり、市販されているものは、一般に高価である。

【0008】このような状況から、モノクローナル抗体と比較しても、遜色の無い高い選択性を持って、標的化学物質と結合でき、加えて、化学合成などで容易に、また、安価に調製することができる標的化学物質と選択的な結合能を有するペプチドを、モノクローナル抗体に代えて利用することが望まれる。前記の目的から、標的化学物質との結合に関与する、構造認識アミノ酸配列を簡便に解明することが必要となる。

【0009】確かに、ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリー法を利用すると、数多くの候補とクローンの有するアミノ酸配列から、目的とする構造認識アミノ酸配列に関するモチーフ（アミノ酸の種類とそれらの相対的位置に関する情報）が得られる。ペプチドライブラリーに含まれるペプチドの種類は、そのペプチド鎖長（ n ）が長くなるほど大きくなるが（20ⁿ種類）、その中から選別されるクローンの有するアミノ酸配列は、標的化学物質に対する選択性も高くなることが期待できる。一般に、ペプチド鎖長が長くなると、標的化学物質と結合する際、より多くのアミノ酸が結合と直接的に関与し、その結果、より多点での識別が可能となると考えられる。一方、ペプチド鎖長が長くなると、結合に関与する部分アミノ酸配列（モチーフ）以外のアミノ酸数も増し、その部分における配列の自由度も高くなる。従って、結合に関与する部分アミノ酸配列を除く、これら自由度を持つ複数のアミノ酸の選択によっては、生体試料中に含まれる他の化学物質とも結合してしまうものとなる。つまり、ペプチド鎖長を長くしたからといって、必ずしも標的化学物質に対する選択的な結合能が向上しない場合も少なからずある。

【0010】なお、先行技術の例として挙げた、特開平11-290076号公報の事例では、天然型タンパク質と変性型タンパク質との構造上の差異を識別する構造認識アミノ酸配列を取得する方法を開示しているが、この事例では、ペプチドライブラリーを、天然型タンパク質に結合できることと、変性型タンパク質に結合できないことと、この二つの選択基準のみでスクリーニングしている。すなわち、生体試料中に含有する、他の多種類のタンパク質などの化学物質との結合能の有無は検証されておらず、原理的には、標的化学物質である天然型タンパク質のみと選択的に結合するアミノ酸配列を取得する方法とは、言えないものである。対象とするタンパク質が、天然型の構造か、変性しているか、その構造の区別には適しているものの、モノクローナル抗体に代えて、他に雑多な化学物質を含有する生体試料中に、目的とする標的化学物質が存在するか否かを高い確度で検定する目的には、厳密な意味では利用できないものである。

【0011】すなわち、標的化学物質のみと選択的に結合するアミノ酸配列を有し、モノクローナル抗体に代えて、他に雑多な化学物質を含有する生体試料中に、目的とする標的化学物質が存在するか否かを高い確度で検定する目的にも利用が可能なペプチドを簡便に見出す方法が望まれている。

【0012】本発明は前記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、標的化学物質のみと選択的に結合するアミノ酸配列を有し、モノクローナル抗体に代えて、他に雑多な化学物質を含有する生体試料中に、目的とする標的化学物質が存在するか否かを高い確度で検定

する目的にも利用が可能なペプチドを創製する上で必要となる。構造認識アミノ酸配列を取得する方法を提供することにある。より具体的には、安価に、また容易に化学合成することができ、生体試料中の標的化学物質の構造を識別し、これと選択的に結合することのできるペプチドを設計する際、その標的化学物質との結合に関与する構造認識アミノ酸配列を簡便に決定する方法を提供することが、本発明の目的である。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題を解決すべく、鋭意検討・研究を進め、その結果、目的とする標的化学物質との結合能に基づき、ペプチドライブラリーをスクリーニングした後、選別される標的化学物質との結合能を有する一群のペプチドについて、かかる標的化学物質自体は含有しないが、その他の本来含むべき種々の生体物質を含む生体試料を用いて、それら他の本来含むべき種々の生体物質との結合は実質的に起こさないペプチドのみを更にスクリーニングすると、挟雑物による干渉を排し、目的とする標的化学物質とのみ選択的に結合するペプチドを採取することが可能であることを見出した。すなわち、予め標的化学物質と高い結合能を有するペプチドを選別し、その内、他の挟雑物との結合能を示すものを排除することで、より効率的に目標とする標的化学物質とのみ選択的に結合するペプチドを採取することが可能であることを見出した。本発明者は、然る後、採取された少数種のペプチドについて、そのアミノ酸配列を解析することにより、標的化学物質とのみ選択的に結合する際、その結合に関与する構造認識アミノ酸配列を取得することができることを確認して、本発明を完成するに至った。

【0014】すなわち、本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法は、生体試料に含有されうる標的化学物質の構造を認識し、前記標的化学物質と選択的な結合形成するペプチドに利用される構造認識アミノ酸配列を決定する方法であって、所定のアミノ酸長を有する可変領域がランダムなアミノ酸配列で構築されてなるペプチドライブラリーから、前記標的化学物質のみを担体上に固定化してなる第1のスクリーニング担体を用いて、前記第1のスクリーニング担体上に吸着するペプチド画分を分取する第1のスクリーニング工程と、前記第1のスクリーニング工程で採取される吸着するペプチド画分に含まれるペプチド群から、前記生体試料に含有される、前記標的化学物質以外の生体物質を非選択的に担体上に固定化してなる第2のスクリーニング担体を用いて、前記第2のスクリーニング担体上に吸着するペプチド画分を除き、前記第2のスクリーニング担体上に吸着しないペプチド画分のみを分取する第2のスクリーニング工程と、前記第2のスクリーニング工程で採取される、前記標的化学物質との結合能を有し、かつ、前記生体試料に含有される、その他の生体物質とは有意に結合しないペプチ

ド画分から、それに含まれる各ペプチドについて、少なくとも、その由来するペプチドライブラリーの可変領域を含む、所定アミノ酸長の部分アミノ酸配列を決定するアミノ酸配列解析工程とを含み、前記のアミノ酸配列解析工程において、解明された前記各ペプチドの有する部分アミノ酸配列から前記ペプチドライブラリーの可変領域に相当する構造認識アミノ酸配列を決定することを特徴とする構造認識アミノ酸配列の取得方法である。

【0015】なお、前記標的化学物質がタンパク質である際、本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法は、より有効な方法となる。また、前記第2のスクリーニング担体の調製にもちいる担体として、陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂との混合物からなる担体を用いることが好ましい。

【0016】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法は、前記標的化学物質を含有する可能性を有する生体試料自体は、血漿または細胞破碎抽出液である際、より好ましい方法となる。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法がその対象とする標的化学物質は、生体試料中に含有する種々の成分のうち、タンパク質、脂質、核酸、糖鎖、ならびにそれらの複合体など、その存在の有無、存在量の多寡が、生体自体の状態、例えば、疾病の有無やその進行状態などを反映する化学物質であって、加えて、何らかのペプチドと分子間の相互作用により結合を形成するものである。前記標的化学物質とペプチドとの結合は、これらタンパク質、脂質、核酸、糖鎖、ならびにそれらの複合体などにおいて、その分子表面上の特定な部位においてのみ、標的化学物質の構造が認識されるものをいう。従って、標的化学物質の分子量自体、その上限については特に限定はないものの、標的化学物質の種類に応じて、自ずからそれぞれ分子量の下限がある。例えば、タンパク質であれば、一般に、抗原決定基として免疫系を発動する際、最低限必要とされるアミノ酸数、具体的には、4～5個のアミノ酸がペプチド結合したペプチド鎖を有するものであり、従って、その分子量の下限はおおよそ500以上となる。また、糖鎖についても、同様に、少なくとも3～5個の糖が重合した部分鎖を有するものであり、その分子量の下限はおおよそ200以上となる。一方、核酸に関しては、一本鎖か二本鎖かにもよるが、少なくとも、3～5個の塩基を含む鎖を含むものである。脂質に関しては、対応する脂肪酸グリセリド部分を有するため、その分子量下限は、自ずから定まり、おおよそ200以上となる。

【0018】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法は、ランダム・ペプチドライブラリーから標的化学物質とのみ選択的に結合するペプチドを選別するが、利用するペプチドライブラリーには、コンビナトリアルケミストリーの手法を用いて、例えば、ビーズなどの粒状固相

上に化学合成することにより調製したものや、遺伝子工学的手法を用いて、例えばM13ファージのような非溶菌性ファージのマイナーコートタンパク質上に発現させたランダムペプチドライブラリー(ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリー)などを用いることができる。

【0019】前記のファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーを構築する方法には、例えば、M13系ファージの表面蛋白質(例えば、geneIII蛋白質)をコードする遺伝子中、geneIII蛋白質のN末端側に相当する部位に、別途調製したランダムな塩基配列を持つ合成遺伝子を連結して作製する手法を利用できる。このようなファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーの構築方法は、既にScott, JK. and Smith, GP., Science Vol. 249, 386, 1990, やCwirla, SE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, 6378, 1990などに報告がある。ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーの構築に際し、挿入する合成遺伝子の大きさ; 対応するペプチド鎖のアミノ酸数は、かかるペプチドが安定に発現できる限り、特に制限はない。しかしながら、構築したライブラリーは、発現される挿入ペプチド部分が他のタンパク質などとの結合能を有するためには、少なくとも6アミノ酸長以上であることが望ましい。一方、構築したライブラリーは、すべてのランダム配列を網羅するものであるため、その挿入ペプチド部分が40アミノ酸長を超えると、その全体量(種類)が多くなり過ぎる。従って、挿入ペプチド部分は、6~40アミノ酸に相当する長さ(分子量約600から4000に相当)の範囲に選択するのが適当で、通常、6~35アミノ酸の範囲に選択することが好ましい。

【0020】前記の挿入ペプチド部分のアミノ酸長を満たす限り、本発明の方法に利用されるファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーの種類及び調製方法は特に限定されない。具体的には、公知の方法(西徹ら、実験医学, Vol. 11, No. 13, pp. 1759-1764)に従って作製したものを用いればよいが、市販のファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリー、例えば、The pSKAN Phagemid Display System (MOLECULAR BIOLOGISCHE TECHNOLOGIE社製)などを購入して用いてもよい。

【0021】本発明の方法を実施する際、好適に使用できるファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーは、その構築に利用するファージとして、M13ファージ、fdファージまたはf1ファージのような公知の繊維状ファージを用いるものである。これらM13ファージ、fdファージまたはf1ファージなどは、極めて近い類縁関係にあり、何れも大腸菌のF⁺菌株のみ感染することができる。これらファージの感染は、F⁺菌の性線毛に吸着することによって開始される。その選択的吸着は、ファージ尾部の先端に露出しているタン

パク質が、F⁺菌の性線毛に対して特異的な親和性を有することに起因する。そこで、これらのファージ遺伝子中、このタンパク質をコードする部分に、ランダムペプチドをコードする合成遺伝子を組み込む。これによって、合成遺伝子によりコードされるランダムペプチドが挿入されたタンパク質を、ファージの先端に露出させることができる。この遺伝子組換え操作と、タンパク質発現の詳細な方法は、例えば下記の文献に記載されている。

・Stephen F. Parmley and George P. Smith; Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes; Gene, 73(1988), pp. 305-318

・John McCafferty et al.; Phage antibodies: filamentous phages displaying antibody variable domains; NATURE, vol. 348, 6(1990)

後述する方法によってスクリーニングされたファージクローンから、ディスプレイされている挿入ペプチド部のアミノ酸配列を決定するには、合成遺伝子の挿入部位は既知であるので、増幅したファージからDNAを抽出し、前記挿入部位を含む領域を適当なプライマーを用いてPCR反応を行うことによって採取する。得られたPCR産物から、それに含まれるランダム領域の塩基配列をシーケンシングして、コードしているアミノ酸配列を解明すればよい。

【0022】ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドライブラリーの作製方法としては、前述のファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーを利用する以外に、化学合成したペプチドを用いることも可能である。この化学合成ペプチドからなるペプチドライブラリーの調製方法としては、例えば、ビーズを用いる方法(Lam, KS et al., Nature, 354, 82, 1991)、液相フォーカシング法(Houghton, RA et al., Nature, 354, 84, 1991)、マイクロプレート法(Fodor, SPA et al., Science, 251, 767, 1991)などが報告されている。

【0023】本発明の方法において、第1のスクリーニング工程では、担体上に固定化した標的化学物質を用いてスクリーニングを行う。この標的化学物質固定化する担体には、標的化学物質を固定化しうるものであれば何れも利用できるが、利用可能な担体の例として、架橋デキストランビーズ、ポリスチレンビーズ、イオン交換樹脂ビーズ、ポリスチレン、ガラス、セルロース、ポリビニルアルコール、ポリサルフォン、シリカゲルなどがあげられる。固定化に用いる担体の形状としては、リガンドである標的化学物質を固定化する面積が広がるので、例えば、プレート、シャーレおよびビーズが好ましく、より好ましくは、ビーズ形状とする。本発明の方法において、標的化学物質の担体上への固定化は、疎水性相互作用に基づく物理的吸着、あるいは、静電的相互作用に基づく非共有結合、さらには架橋構造を形成させる

共有結合などの結合形成、これらのいずれの手段を用いた固定化であってもよい。

【0024】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法では、まず、第1のスクリーニング工程において、前記標的化学物質のみを担体上に固定化してなる第1のスクリーニング担体に、上記ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドライブラリーを共存させ、固定化された標的化学物質にアフィニティを有するペプチドをスクリーニングする。非吸着画分を洗浄により除去した後、第1のスクリーニング担体上に吸着した画分は、酸などによる溶出を経て分画される。例えば、ファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーを利用する場合、分画されたペプチドディスプレイ・ファージは、大腸菌などに感染させることによって増幅させることができる。この増殖した、吸着画分のペプチドディスプレイ・ファージを次の第2のスクリーニング工程に用いることができる。

【0025】本発明の方法では、第2のスクリーニング工程では、前記生体試料に含有される、前記標的化学物質以外の生体物質を非選択的に担体上に固定化してなる第2のスクリーニング担体を利用される。この第2のスクリーニング担体を調製する際、標的化学物質のみを含まない生体試料が利用される。例えば、標的化学物質がタンパク質である場合、生体試料に対して、この標的タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、その通過画分を分取することによって調製することができる。標的化学物質がタンパク質であっても、それに対するモノクローナル抗体が利用できない場合は、別途、標的タンパク質をコードする遺伝子を取得し、遺伝子組み換えによって、その一部分に精製用のタグを予め導入し、組み換え型標的タンパク質中に存在するこの精製用タグに対するアフィニティークロマトグラフィーを行うことによって、効率的に組み換え型標的タンパク質のみを生体試料中から分離、除去することができる。さらには、例えば、標的タンパク質を欠失した細胞をクローン化することによって標的タンパク質を含まない生体試料を調製することもできる。また、標的化学物質が、タンパク質と、脂質、核酸、糖鎖のいずれかが複合した複合体の場合にも、前記の手法を利用して、標的化学物質を含まない生体試料を調製することもできる。標的化学物質が、脂質、糖鎖である場合にも、適当なアフィニティークロマトグラフィー法を利用して、選択的に生体試料中から除去を図ることができる。一方、標的化学物質が、核酸である場合には、標的核酸に対して相補的な塩基配列と除去用配列とを有する核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション法を利用することで、選択的に生体試料中から除去を図ることができる。

【0026】なお、標的化学物質がある種の疾病に関連するものである場合には、かかる疾病に罹患していない

健康者から採取される生体試料は、標的化学物質を本質的に含有しないこともある。その場合には、標的化学物質を本質的に含有しない、健康者から採取される生体試料をもって、標的化学物質を選択的に除去した生体試料の代用とすることができる。この場合、生体試料としては、血清または細胞破碎抽出液が好ましい。これら血清や細胞破碎抽出液など生体試料のうち何れを利用できるかは、標的化学物質が何に由来するかに基づいて決定することができる。

【0027】前記生体試料に含有される、標的化学物質以外の生体物質を非選択的に担体上に固定化してなる第2のスクリーニング担体を利用する担体には、タンパク質、脂質および核酸など生体試料中に含有される生体物質を固定化しうるものであれば、どのような担体を用いてもよい。利用可能な担体の例として、架橋デキストランビーズ、ポリスチレンビーズ、イオン交換樹脂ビーズ、ポリスチレン、ガラス、セルロース、ポリビニルアルコール、ポリサルフォン、シリカゲルなどがあげられる。固定化に用いる担体の形状としては、リガンドである生体試料中の種々の生体物質成分を固定化する面積が広がるので、プレート、シャーレならびにビーズ形状が好ましく、ビーズ形状がより好ましい。

【0028】この第2のスクリーニング担体を調製する際、生体試料中の各種の生体物質成分の固定化には、疎水性相互作用に基づく物理的吸着、あるいは、静電的相互作用に基づく非共有結合、さらには架橋構造を形成させる共有結合などの結合形成、これらのいずれの手段を用いた固定化であってもよい。一般に、生体試料中にはタンパク質や核酸など多種類の成分が共存しており、例えば、タンパク質についてみても、タンパク質個々は様々な疎水性性質、親水性性質、そして荷電を有している。第2のスクリーニング担体は、これら性質が異なる多種・多様な成分をその種類に依らず、可能な限り全てを担体上に固定化することが望ましい。従って、利用する担体として、その表面の性質が異なる担体複数種を混合使用することで、多種・多様な成分をより効率的に固定化することが望ましい。具体的には、利用可能な担体の例として上に挙げたものから、その表面の性質が異なる担体複数種を選択し、適当な割合で混合したものを担体として用いることが望ましい。例えば、陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂の混合物は、試料の水素イオン濃度に依らず、多くの種類のタンパク質を吸着することができ、本発明の方法において、第2のスクリーニング担体を調製する際に担体に好適に利用することができる。

【0029】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法では、第2のスクリーニング工程において、第1のスクリーニング工程で分取された画分、あるいは、分取された画分に含まれる一群のファージを予め増幅したペプチドディスプレイ・ファージを、上記第2のスクリーニン

グ担体に対して共存させ、それと結合するものを排除する。生体試料中に含まれる、標的化学物質以外の各種生体物質に対してアフィニティーを持たないペプチドのスクリーニングを行う。この第2のスクリーニング工程により選別されるペプチドは、標的化学物質に対する高い結合能を有するものの、それ以外の各種生体物質に対しては、結合能を示さないペプチドとなる。

【0030】なお、ファージ・ディスプレイ・ランダムペプチドライブラリーを利用している際には、この第2のスクリーニング工程において分画されたペプチド・ディスプレイファージは、大腸菌などに感染させることによって増幅させることができる。最終的に選別されたペプチドディスプレイ・ファージ分画には、複数種のペプチドディスプレイ・ファージが含まれることもあるが、それから単一なクローンを得るため、再度大腸菌にファージを感染させ、抗生物質を含んだ寒天培地上でシングルコロニーを形成させる。採取される個々のコロニーを液体培地で培養した後、上清中のファージをポリエチレングリコール等で沈澱・濃縮し、所定の位置に組み込まれた合成DNAを含む部分領域の塩基配列を決定することにより、標的化学物質との結合に関与するペプチドの一次構造（アミノ酸配列）を知ることができる。

【0031】一方、化学合成によって作製されたランダムペプチドライブラリーを利用している際には、分取された一群のペプチド、例えば、粒状固相上に合成されたペプチドを単離し、そのN末端からエドマン分解によるシーケンシングによってアミノ酸配列を決定することができる。

【0032】なお、化学合成によって作製されたペプチドライブラリーを用いる際、アミノ酸配列解析工程に要するペプチド量を確保する目的で、第1のスクリーニング工程後、一旦アミノ酸配列を決定することにより、標的化学物質に対する結合活性を示すアミノ酸モチーフを、おおよその絞り込みを行う。改めて、このアミノ酸モチーフを含むペプチドライブラリーを合成によって調製し、この粗い絞り込みを終えたペプチドライブラリーを、第2のスクリーニング工程に使用することもでき、同じく、本発明の効果が得られる。

【0033】この一連の工程により取得された構造認識アミノ酸配列は、生体試料中の標的化学物質に対して選択的な結合活性を示すものである。この構造認識アミノ酸配列に基づき、それを部分アミノ酸配列として含むように調製されたペプチドは、標的化学物質の選択的標識やアフィニティーリガンドとして利用することが可能である。

【0034】

【実施例】以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。なお、これら実施例は、本発明の最良の実施の形態の一例ではあるものの、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

【0035】（実施例1）タンパク質フォスファターゼ1(PP1)に対する構造認識アミノ酸配列の取得タンパク質フォスファターゼ1(PP1, EC 3.1.3.16.)は、真核生物の細胞内に存在するセリン スレオニン フォスファターゼの一種である。このPP1は、炭水化物や脂質の代謝機構、カルシウム輸送、イオンチャンネルの開閉、筋肉の収縮、核の構成、タンパク質の生合成、有糸分裂、減数分裂など、多くの細胞活動において、重要な役割を担っていると考えられている。

【0036】PP1は、ヘテロダイメリックな構造をしており、セリン/スレオニン フォスファターゼ酵素活性を持つキャタリティック・サブユニット(PP1 α)と、基質特異性を決めるターゲッティング・サブユニットとから構成されている。例えば、ヒト肝臓由来のPP1では、そのPP1 α は330個のアミノ酸から成っているが、PP1 α に対する構造認識アミノ酸配列として、従来より、Val-Xaa-PheまたはVal-Xaa-Tyrというモチーフを含むアミノ酸配列が知られている。ただし、Xaaは、HisまたはArgである(Zhao S, Lee EY J. Biol. Chem. 1997 Nov 7; 272(45):28368-28372)。報告には、この三アミノ酸からなる配列モチーフ以外は、特に限定されていないが、前記配列モチーフ以外のアミノ酸配列の選択によっては、生体試料中に含まれる夾雑物と非特異的な結合を起こすことも想定できる。その場合には、PP1 α 上の標的構造の特異的認識が妨げられてしまう可能性がある。そこで、本実施例では、この三アミノ酸からなる配列モチーフ以外のアミノ酸配列を含め、標的タンパク質PP1に対する構造認識アミノ酸配列を取得するため、本発明の方法が有効であることを検証した。

【0037】(1) PP1 α 溶液の調製

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社製タンパク質フォスファターゼ1 (PP1 α)を、リン酸緩衝液（組成：6g/L Na₂HPO₄, 3g/L KH₂PO₄, 0.5g/L NaCl, 1g/L NH₄Cl, pH 7.4）に溶解し、同じリン酸緩衝液で平衡化したセファクリルS-200を用いたゲル濾過法により精製した。その後、透析して脱塩し、300mg/mlのタンパク質濃度になるように希釈して、PP1 α 溶液を調製した。

【0038】(2) PP1 α の固定化

PP1 α 溶液を、0.1M炭酸水素ナトリウム(pH8.6)に対して透析した後、100mg/mlのタンパク質濃度になるように希釈した。この希釈液1.5 mlをポリスチレン製プレートに入れ、4℃で12時間放置した。その後、ウシ血清アルブミン(BSA)を含むブロッキングバッファー(0.1M NaHCO₃ (pH8.6), 5mg/ml BSA, 0.1mg/ml streptavidin, 0.02%NaN₃)をプレートに満たし、4℃で1時間静置し、余分な結合サイトをブロッキングした。ブロッキングバッファーを捨て、TBSTバッファー(TBSバッファー + 0.1%Tween n-20)でプレートを10回洗浄した。

【0039】(3) ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーからのパニング

PP1 α の固定化を施したプレートに、 1.5×10^{11} pfuのPh.D.-12ファージ・ディスプレイ・ライブラリー (NewEngland Biolabs, Inc.) を加え、1時間室温に放置した。その後、TBS (50mM トリス-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.1% Tween-20) で10回洗浄し、未結合のファージを除去した。次いで、pH2.2のバッファー (0.2M グリシン-HCl (pH2.2)、1mg/ml BSA) により、プレート上に結合したファージを回収した。回収したファージを、大腸菌ER2537株 (NewEngland Biolabs, Inc.) に感染させ、増幅を行った。この一次スクリーニングで分画、増幅されたファージを用いて、同様の操作で二次スクリーニングを実施

した。合計3段回、スクリーニング操作を繰返した。

【0040】この多段スクリーニング後、最終的に増幅されたファージを一部採り、これをクローン化した。単離された35個のクローンから、それぞれssDNAを調製し、ランダム領域の塩基配列を決定した。表1に、解読された塩基配列がコードするランダム領域のアミノ酸配列を示す。なお、既に報告されているVal-Xaa-PheまたはVal-Xaa-Tyrの共通する三アミノ酸部分を対応させて、相互のアミノ酸配列を対比させている。

【0041】

【表1】

略名	アミノ酸配列	クローン数
R1VRHKRVRFADV.....	2
R2VKRVRFREQGAA.....	1
R3RAKKQVRFADLR.....	2
R4	..RWVKTEARHVRF.....	1
R5SKRVHFGGRPR.....	1
R6STRHVHWDREA.....	10
R7RVSRRHVHWADLE.....	7
R8RRVHFDNGESGA.....	4
R9	..RKVPGAARRVHW.....	2
R10KKRVWVDQAAC.....	5

合計 35

【0042】(4) PP1を含まない生体試料の調製

PP1は細胞内に局在するタンパク質であり、通常血漿中には見出されない。細胞が何らかの原因で障害を受けた際、血液中に溶出されてくる。そこで、ウシ血清 (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社製) を更なる精製を施さず、そのままPP1を含まない生体試料として、代用した。

【0043】(5) PP1を含まない生体試料中の生体物質成分の固定化

強陰イオン交換樹脂 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製Q Sepharose HP)、および強陽イオン交換樹脂 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製SP Sepharose HP) に、それぞれ結合容量の2倍量のタンパク質量を含むウシ血清を加え、1時間放置することによって固定化した。その後、強陰イオン交換樹脂は50mMリン酸緩衝液 (pH7.4) で、また、強陽イオン交換樹脂は50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で、それぞれ洗浄し、未固定の成分を除いた。

【0044】(6) バンニング

(3)の工程で最終的に増幅されたファージを、(5)の工程で調製した、生体試料中の生体物質成分の固定化処理を施した強陰イオン交換樹脂に添加し、室温で1時間放置した。デカンテーションにより上清を分取し、この上清を、生体試料中の生体物質成分の固定化処理を施した強陽イオン交換樹脂に添加し、さらに室温で1時間放置した。デカンテーションによって上清を採り、採取した未吸着画分に含まれるファージを、大腸菌ER2537株に感染させ、増幅した。

【0045】増幅されたファージを一部採り、これをクローン化した。単離された35個のクローンから、それぞれssDNAを調製し、ランダム領域の塩基配列を決定した。表2に、解読された塩基配列がコードするランダム領域のアミノ酸配列を示す。なお、既に報告されているVal-Xaa-PheまたはVal-Xaa-Tyrの共通する三アミノ酸部分を対応させて、相互のアミノ酸配列を対比させている。

【0046】

【表2】

略名	アミノ酸配列	クローン数
S1VRHKRVRFADV.....	26
S2SKRVHFGGRPR.....	9

合計 35

【0047】(7) アミノ酸配列の選択的構造認識機能の比較

(3)の工程でPP1 α に対する親和性に基づいて選別された10種類のアミノ酸配列 (R1~R10)、(6)の工程で血清タン

パク質に対する非親和性に基づいて、さらに選別された2種類のアミノ酸配列 (S1=R1、S2=R5) について、これら計10種類のアミノ酸配列を含有するペプチドをFmoc法を用いて化学合成した。その際、各ペプチドのC末端側

に、Ser-Ser-Ser-Gly-Cysの5アミノ酸長の配列を付加し、全長を(12アミノ酸+5アミノ酸)とした。

【0048】合成した各ペプチドを、そのC末端Cys残基のSH基を介して、表面プラズモン共鳴センサ(SPRセンサ 電気化学計器株式会社製)金薄膜センサチップ上に固定化した。次いで、ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングを施した後、TBSTに溶解させた各種濃度のPP1 α をSPRセンサに導入し、共鳴角度の時間変化をモニターすることによって、各ペプチドとPP1 α との親和性を解析した。

【0049】さらに、ウシ血清中にPP1 α を加え、これをSPRセンサに導入し、同様にセンサグラムを測定した。図1は、アミノ酸配列S1のペプチドを固定化した場合のセンサグラムの測定結果を示す。アミノ酸配列S2のペプチドを固定化した場合にも、図1に示す結果と同様なセンサグラムが得られた。図1に示すように、PP1 α の導入濃度が高くなるにつれて、共鳴角変化量は大きくなり、本実施例で取得したアミノ酸配列S1とS2のペプチドは、血清タンパク質の影響を受けず、PP1 α を選択的に識別して結合していることが判る。図2、図3は、アミノ酸配列R6とR7のペプチドをそれぞれ固定化した場合のセンサグラムの結果を示す。この対比から、夾雑タンパク質に対する結合能に基づく、第2のスクリーニング工程を設けていない、従来法で取得されるアミノ酸配列、例えば、R6とR7のペプチドでは、血清中に存在する夾雑タンパク質の非特異的吸着のため、定量的なPP1 α の応答が得られないことがわかる。図4に、アミノ酸配列S1とS2のペプチド、ならびにアミノ酸配列R6とR7のペプチド、それぞれのペプチドを用いた場合について、測定された共鳴角変化量の、ウシ血清中に含まれる標的タンパク質PP1 α 濃度に対する依存性を示す。

【0050】(実施例2)トロポニンC(TnC)に対する構造認識アミノ酸配列の取得

トロポニンCは、トロポニンを構成する3種類のサブユニットのうちの一つであり、トロポニンを6M尿素で処理することにより分離される。トロポニンCは、SDS-PAGEで分子量18kDaのバンドを与え、他のサブユニット、40kDa、24kDaのバンドはそれぞれトロポニンT(TnT)、トロポニンI(TnI)と呼ばれる。TnCは酸性タンパク質で、高い水溶性を有する。TnCは、カルシウムイオンを4mol/mol結合し、カルシウムの結合に伴い、その立体構造が変わる。カルシウム結合型のTnCは、TnIと強く結合し、TnIのATPアーゼ阻害活性を抑える。トロポニンの活性は、TnT:TnI:TnC=1:1:1のモル比のとき最大となる。トロポニン自体は、トロポミオシン(TM)およびアクチンと、モル比1:1:7の割合で結合し、筋フィラメントを形成する。

【0051】TnCに対する構造認識アミノ酸配列として、(V/L)(D/E)XLKXXLXXLAというモチーフを含むアミノ酸配列が従来より知られている(Pierce H.H.ら J. Bio. Chem. 1998 Sept. 4; 273(36):23448-23453)。な

お、Xは任意のアミノ酸を意味するが、その選択によっては、生体試料中に含まれる夾雑物との非特異的な結合を起こす可能性がある。その場合、標的TnCに対する、構造特異的な認識が妨げられてしまう。そこで、本実施例では、上記の配列モチーフに含まれるXの部分を含め、TnCに対する選択性に優れた構造認識アミノ酸配列を取得する際、本発明の方法が有効であることを検証した。

【0052】(1) TnCの調製

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社製トロポニン(Tn)を6M尿素で処理し、他のサブユニットと分離した後、Phenyl-Sepharoseカラムを用いたクロマトグラフィーにより精製した。精製したTnCは、150mM NaClを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、TnC溶液とした。

【0053】(2) TnCの固定化

TnC溶液を0.1M炭酸水素ナトリウム(pH8.6)に対して透析した後、100mg/mlのタンパク質濃度になるように希釈した。この希釈液1.5 mlをポリスチレン製プレートに入れ、4°Cで12時間放置した。その後、ウシ血清アルブミン(BSA)を含むブロッキングバッファー(0.1M NaHCO₃(pH8.6), 5mg/ml BSA, 0.1mg/ml streptavidin, 0.02%NaN₃)をプレートに満たし、4°Cで1時間静置し、余分な結合サイトをブロッキングした。ブロッキングバッファーを捨て、TBSTバッファー(TBSバッファー + 0.1%Tween-20)でプレートを10回洗浄した。

【0054】(3) ファージ・ディスプレイ・ペプチドライブラリーからのパンニング

TnCの固定化を施したプレートに、 1.5×10^{11} pfuのPh.D.-12ファージ・ディスプレイ・ライブラリー(NewEngland Biolabs, Inc.)を加え、1時間室温に放置した。その後、TBSTバッファー(50mMトリス-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20)で10回洗浄し、未結合のファージを除去した。次いで、pH2.2のバッファー(0.2Mグリシン-HCl(pH2.2), 1mg/mlBSA)により、プレートに結合したファージを回収した。回収した結合分画のファージを、大腸菌ER2537(NewEngland Biolabs, Inc.)に感染させ、増幅を行った。この一次スクリーニングで分画、増幅されたファージを用いて、同様の操作で二次スクリーニングを実施した。合計3段階、スクリーニング操作を繰返した。

【0055】この多段階スクリーニング後、最終的に増幅されたファージを一部採り、これをクローン化した。単離された35個のクローンから、それぞれssDNAを調製し、ランダム領域の塩基配列を決定した。表3に、解読された塩基配列がコードするランダム領域のアミノ酸配列を示す。なお、既に報告されている配列モチーフ(V/L)(D/E)XLKXXLXXLAの共通するアミノ酸部分を対応させて、相互のアミノ酸配列を対比させている。

【0056】

【表3】

略名	アミノ酸配列	クローン数
R21	LDQLKTLTSLHLA	2
R22	LDYKSSLLHLG	1
R23	LEELKESLRVLA	2
R24	LEYLKSTLLHLA	1
R25	VDALKDKLQSLG	1
R26	VDELKLLSLTLV	9
R27	VDYKDTLLSLA	6
R28	VEELKTSLSRLG	5
R29	VEHLKDLTRVLA	3
R30	VEHLKRLLSRLG	5

合計 35

【0057】(4) TnCを含まない生体試料の調製

TnCは細胞内に局在するタンパク質であり、通常血漿中には見出されない。細胞が何らかの原因で障害を受けた際、血液中に溶出されてくる。そこで、ウシ血清（シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社製）を更なる精製を施さず、そのままTnCを含まない生体試料として、代用した。

【0058】(5) TnCを含まない生体試料中の生体物質成分の固定化

強陰イオン交換樹脂（アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製Q Sepharose HP）、および強陽イオン交換樹脂（アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製SP Sepharose HP）の1:1混合物に総結合容量の2倍量のタンパク質量のウシ血清を加え1時間放置することによって固定化した。固定化を施したイオン交換樹脂混合物は、50mMリン酸緩衝液（pH7.4）で洗浄し、未吸着分を除去した。

略名	アミノ酸配列	クローン数
S3	LDYKSSLLHLG	26
S4	LEYLKSTLLHLA	9

合計 35

【0062】(7) アミノ酸配列の選択的構造認識機能の比較

(3)の工程でTnCに対する親和性に基づいて選別された10種類のアミノ酸配列(R21~R30)、(6)の工程で血清タンパク質に対する非親和性に基づいて、さらに選別された2種類のアミノ酸配列(S3=R22、S4=R24)について、これら計10種のアミノ酸配列を含有するペプチドをFmoc法を用いて化学合成した。その際、各ペプチドのC末端側に、Ser-Ser-Ser-Gly-Cysの5アミノ酸長の配列を付加し、全長を（12アミノ酸+5アミノ酸）とした。

【0063】合成した各ペプチドを、そのC末端Cys残基のSH基を介して、表面プラズモン共鳴センサ（SPRセンサ 電気化学計器株式会社製）金薄膜センサチップ上に固定化した。次いで、ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングを施した後、TBSTに溶解させた各種濃度のTnCをSPRセンサに導入し、共鳴角度の時間変化をモニター

【0059】(6) バンニング

(3)の工程で最終的に増幅されたファージを、(5)の工程で調製した、生体試料中の生体物質成分の固定化処理を施したイオン交換樹脂の混合物に添加し、室温で1時間放置した。デカンテーションによって上清を採り、採取した未吸着画分に含まれるファージを、大腸菌ER2537株に感染させ、増幅した。

【0060】増幅されたファージを一部採り、これをクローン化した。単離された35個のクローンから、それぞれssDNAを調製し、ランダム領域の塩基配列を決定した。表2に、解読された塩基配列がコードするランダム領域のアミノ酸配列を示す。なお、既に報告されている相同性を有するアミノ酸を対応させて、相互のアミノ酸配列を対比させている。

【0061】

【表4】

することによって、各ペプチドとTnCとの親和性を解析した。

【0064】さらに、ウシ血清中にTnCを加え、これをSPRセンサに導入し、同様にセンサグラムを測定した。図5は、アミノ酸配列S3のペプチドを固定化した場合のセンサグラムの測定結果を示す。アミノ酸配列S4のペプチドを固定化した場合にも、図5に示す結果と同様なセンサグラムが得られた。図5に示すように、TnCの導入濃度が高くなるにつれて、共鳴角変化量は大きくなり、本実施例で取得したアミノ酸配列S3とS4のペプチドは、血清タンパク質の影響を受けず、TnCを選択的に識別して結合していることが判る。図6、図7は、アミノ酸配列R26とR27のペプチドをそれぞれ固定化した場合のセンサグラムの結果を示す。この対比から、夾雑タンパク質に対する結合能に基づく、第2のスクリーニング工程を設けていない、従来法で取得されるアミノ酸配列、例えば、

R26とR27のペプチドでは、血清中に存在する夾雑タンパク質の非特異的吸着のため、定量的なTnCの応答が得られないことがわかる。図8に、アミノ酸配列S3とS4のペプチド、ならびにアミノ酸配列R26とR27のペプチド、それぞれのペプチドを用いた場合について、測定された共鳴角変化量の、ウシ血清中に含まれる標的タンパク質TnC濃度に対する依存性を示す。

【0065】

【発明の効果】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法は、ランダム・ペプチドライブラリーを利用し、そのなかから、生体試料中の標的化学物質に対して特異的な結合能力を有するペプチドのスクリーニングで選別し、その全アミノ酸配列に含まれる構造認識アミノ酸配列を取得する際、ペプチドライブラリーをスクリーニングした後、選別される標的化学物質との結合能力を有する一群のペプチドについて、かかる標的化学物質自体は含有しないが、その他の本来含むべき種々の生体物質を含む生体試料を用いて、それら他の本来含むべき種々の生体物質との結合は実質的に起こさないペプチドのみを更にスクリーニングすると、挟雑物による干渉を排し、標的化学物質とのみ選択的に結合するペプチドに含まれる構造認識アミノ酸配列を、高い確度で、また再現性よく、簡便に採取することが可能となる。この方法で取得される構造認識アミノ酸配列に基づき調製される、その構造認識アミノ酸配列を含むペプチドは、生体試料のような多種多様なタンパク質など挟雑物が共存する試料であっても、目的の標的化学物質、例えば、標的タンパク質を高い定量性で検出したり、標識したりする際に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法を用いて、標的タンパク質PP1 α に対する構造認識アミノ酸配列として取得されたアミノ酸配列S1を有するペプチドについて、その標的タンパク質PP1 α の選択的な検出能（結合能）を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

【図2】従来法によって取得された、標的タンパク質PP1 α に対する結合能を示すアミノ酸配列R6を有するペプチドについて、ウシ血清中に存在する夾雑タンパク質に起因する、標的タンパク質PP1 α に対する検出能（結合能）の選択性の低下を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

【図3】従来法によって取得された、標的タンパク質PP1 α に対する結合能を示すアミノ酸配列R7を有するペプチドについて、ウシ血清中に存在する夾雑タンパク質に起因する、標的タンパク質PP1 α に対する検出能（結合能）の選択性の低下を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

【図4】本発明の方法を用いて取得された、標的タンパク質PP1 α に対する構造認識アミノ酸配列S1とS2を有するペプチド、ならびに、従来法を用いて取得された、標的タンパク質PP1 α に対する高い結合能を示すアミノ酸配列R6とR7を有するペプチドについて、夾雑タンパク質を含むウシ血清中に溶解する標的タンパク質PP1 α のタンパク質濃度に対する、測定される表面プラズモン共鳴角度変化量の依存性を示すグラフである。

【図5】本発明の構造認識アミノ酸配列の取得方法を用いて、標的タンパク質TnCに対する構造認識アミノ酸配列として取得されたアミノ酸配列S3を有するペプチドについて、その標的タンパク質TnCの選択的な検出能（結合能）を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

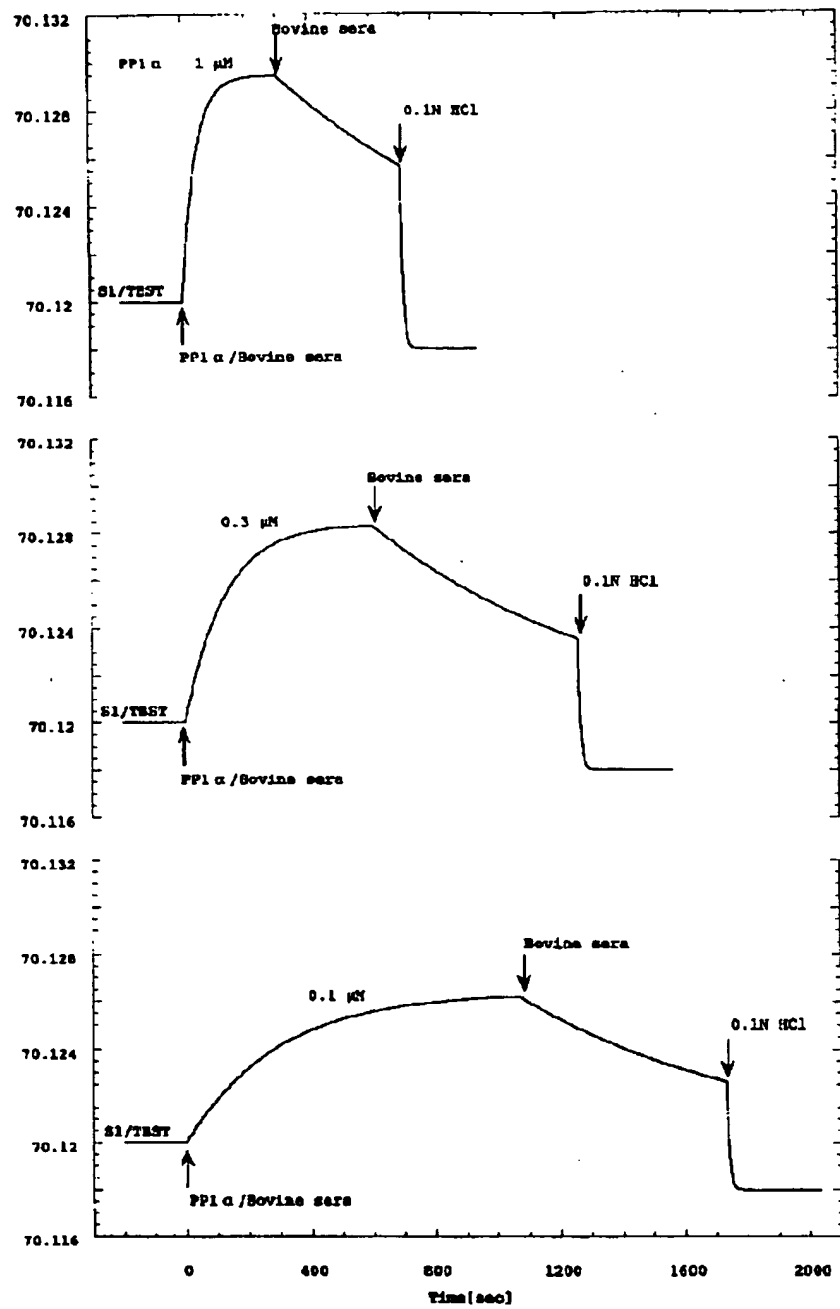
【図6】従来法によって取得された、標的タンパク質TnCに対する結合能を示すアミノ酸配列R26を有するペプチドについて、ウシ血清中に存在する夾雑タンパク質に起因する、標的タンパク質TnCに対する検出能（結合能）の選択性の低下を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

【図7】従来法によって取得された、標的タンパク質TnCに対する結合能を示すアミノ酸配列R27を有するペプチドについて、ウシ血清中に存在する夾雑タンパク質に起因する、標的タンパク質TnCに対する検出能（結合能）の選択性の低下を示す表面プラズモン共鳴センサを用いたセンサグラムの結果である。

【図8】本発明の方法を用いて取得された、標的タンパク質TnCに対する構造認識アミノ酸配列S3とS4を有するペプチド、ならびに、従来法を用いて取得された、標的タンパク質TnCに対する高い結合能を示すアミノ酸配列R26とR27を有するペプチドについて、夾雑タンパク質を含むウシ血清中に溶解する標的タンパク質TnCのタンパク質濃度に対する、測定される表面プラズモン共鳴角度変化量の依存性を示すグラフである。

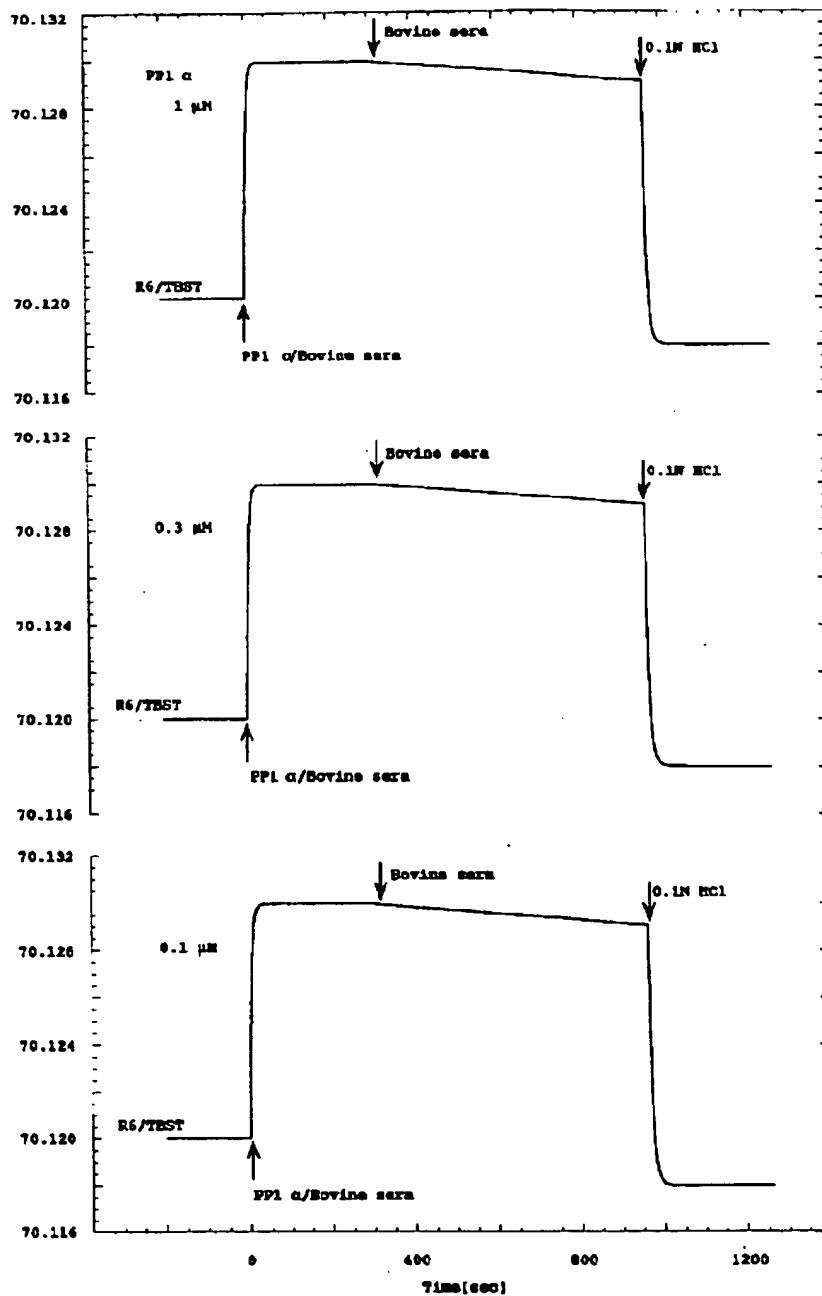
【図1】

表面プラズモン共鳴角度



【図2】

表面プラズモン共鳴角度



Three vertically stacked graphs showing the effect of PP1 α concentration on the R7/TBST assay. The y-axis represents a signal (ranging from 70.116 to 70.132) and the x-axis represents Time[sec] (ranging from 0 to 1200).

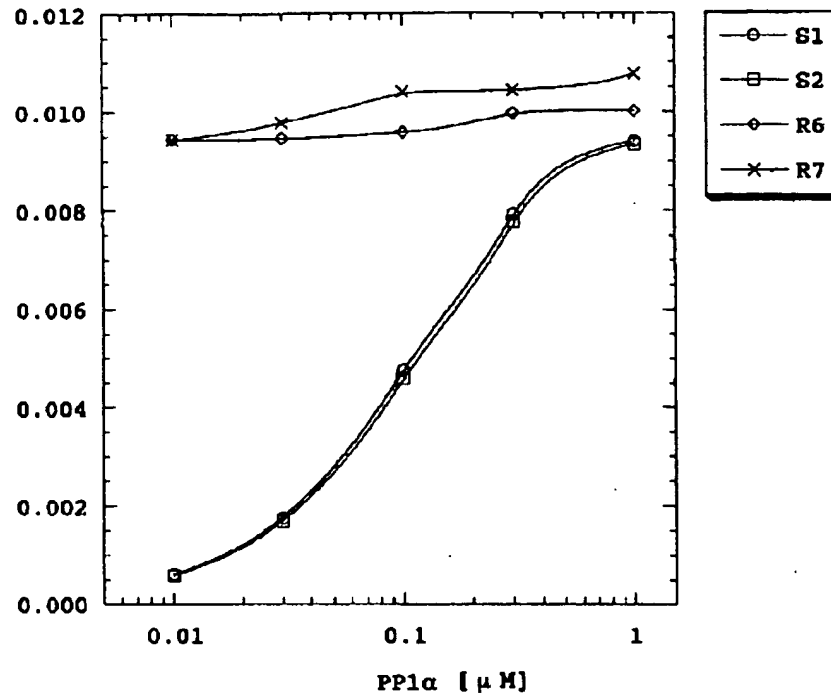
The top graph shows the effect of 1 μ M PP1 α . The signal rises sharply from 70.120 to approximately 70.131 upon the addition of Bovine sera at t=0. The signal remains stable until the addition of 0.1N HCl at t=900, where it drops sharply back to 70.120. The plateau is labeled R7/TBST and the drop is labeled PP1 α /Bovine sera.

The middle graph shows the effect of 0.3 μ M PP1 α . The signal rises sharply from 70.120 to approximately 70.131 upon the addition of Bovine sera at t=0. The signal remains stable until the addition of 0.1N HCl at t=900, where it drops sharply back to 70.120. The plateau is labeled R7/TBST and the drop is labeled PP1 α /Bovine sera.

The bottom graph shows the effect of 0.1 μ M PP1 α . The signal rises sharply from 70.120 to approximately 70.131 upon the addition of Bovine sera at t=0. The signal remains stable until the addition of 0.1N HCl at t=900, where it drops sharply back to 70.120. The plateau is labeled R7/TBST and the drop is labeled PP1 α /Bovine sera.

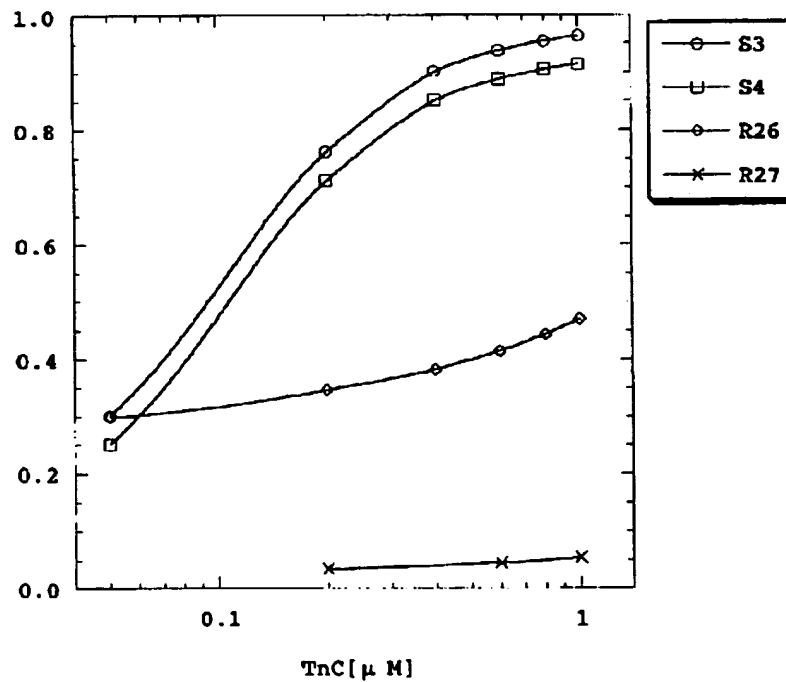
【図4】

表面プラズモン共鳴角変化量[deg]



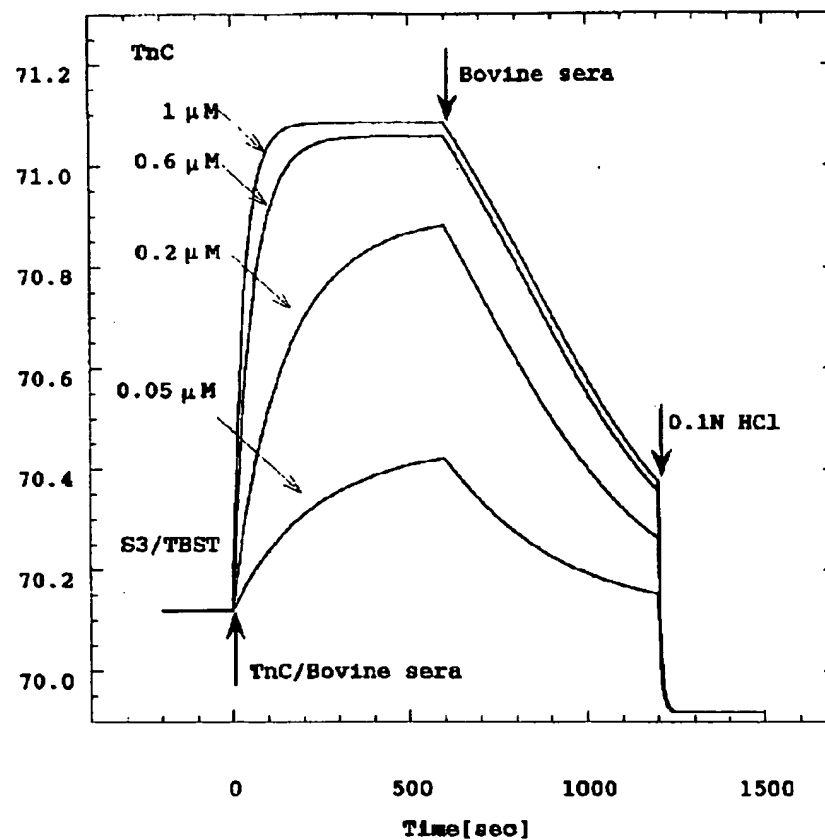
【図8】

表面プラズモン共鳴角変化量[deg]



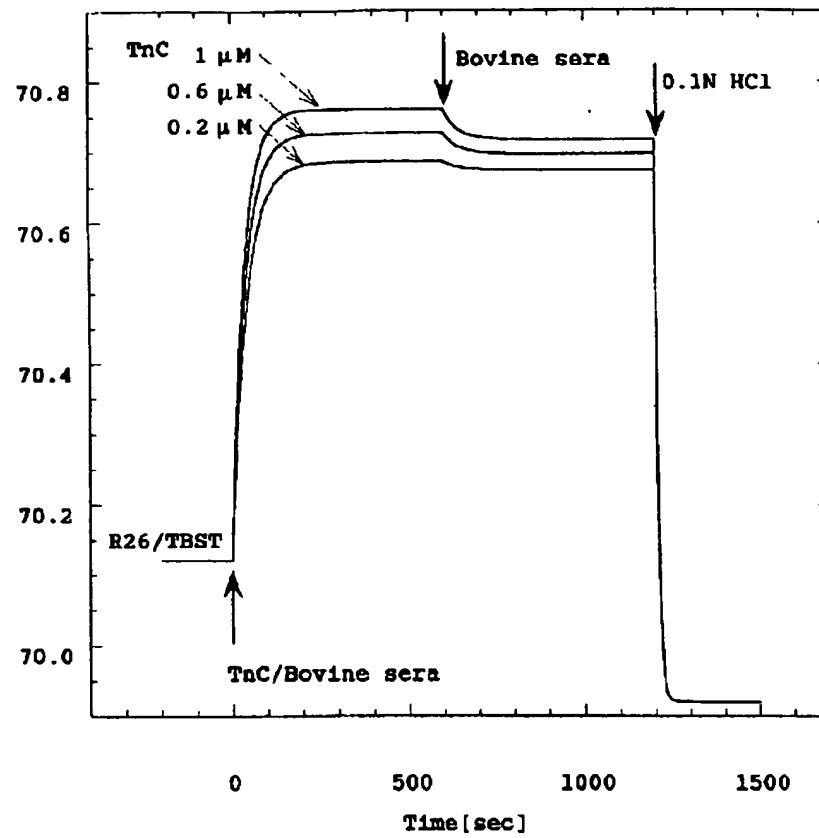
【図5】

表面プラズモン共鳴角度



【図6】

表面プラズモン共鳴角度



【図7】

表面プラズモン共鳴角度

